

Attorney Docket :
32301 WD 232

P A T E N T

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): Mike FARWICK, et al.

Serial No. : Unassigned

Group Art Unit : Unassigned

Filed: September 27, 2001

Examiner : Unassigned

For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE dep67 GENE



CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY

Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

Under 35 U.S.C. §119, Applicants claim the benefit of the filing date of Patent Application **100 47 866.2** filed in **Germany** on **September 27, 2000**.

In support of this claim, a certified copy of the German priority application is attached hereto.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By :

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "R. Weilacher", written over a horizontal line.

Robert G. Weilacher, Reg. No. 20,531
1850 M Street, NW - Suite 800
Washington, DC 20036
Telephone: (202) 659-2811
Facsimile: (202) 263-4329

Date : September 27, 2001



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 47 866.2

Anmeldetag: 27. September 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Neue für das dep67-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. Juli 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Neue für das dep67-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das dep67-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das dep67-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationsstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von

L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das dep67-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
- 30 SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Efflux-Proteins Dep67 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das dep67-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die
5 erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon
10 enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die
15 für das Efflux-Protein Dep67 kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des dep67-Gens aufweisen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung
20 enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das Efflux-Protein Dep67 kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide,
25 enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld
30 herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus
5 hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

10 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der
15 biologischen Aktivität des Efflux-Proteins Dep67 und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

20 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-
25 Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das dep67-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

30 Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise

die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- 5 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der
- 10 Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere
- 15 der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
- 20 *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- 25 und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

Das neue, für das Efflux-Protein Dep67 kodierende dep67-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

- Zur Isolierung des dep67-Gens oder auch anderer Gene von
- 30 *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel

seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc r , der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von

Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das Gen dep67 kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des dep67-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der

Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

- 5 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.
- 10 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70%
- 15 identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ
- 20 niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C
- 25 eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise
- 30 durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist
- 35 gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x

SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des dep67-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom

integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- 5 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen
10 Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung
15 WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in
20 bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

- Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße dep67-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche
25 bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere
30 Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder PNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem dep67-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-

Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

5 So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des dep67-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- 10 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 15 • das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- 20 • das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- 25 • das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),

- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen *ilvA* (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel *ilvA(Fbr)* (Möckel et al.,
5 (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),
- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental
10 Microbiology 65: 1973-1979),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren
15 vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *dep67*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen
20 *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

25 abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *dep67*-Gens

unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- 5 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)
- 10 zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch
- 15 von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im
- 20 Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose,
- 25 Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe
- 30 können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,

Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die
5 entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe
10 wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise
15 während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur
20 Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen
25 aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des
30 gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so
35 wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958),

1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

10 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

20 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of

Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
5 Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
10 Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der
behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04)
15 behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La
Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al.
20 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen
in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der
Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der
Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular
Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor)
25 beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
(Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin
ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C
wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

30 Isolierung und Sequenzierung des dep67-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep
Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden,
Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem

Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems

(Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.
Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der
Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF
Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1,
5 Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377"
Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt,
Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter
Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids
10 Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die
Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem
zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte
Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden,
1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

15 Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1
dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein
offenes Leseraster von 1305 Basenpaaren, welches als dep67-
Gen bezeichnet wurde. Das dep67-Gen kodiert für ein Protein
von 434 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das dep67-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000565 BT

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1786

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (259)..(1560)

<223> dep67-Gen

25

<400> 1

cggcggttttc cgagcgggtg tctagcgcaa cgagtgcgga accgcgttgt tgggcctggc 60

30

tggcgagcat gtgttttgcc acgtcgacgg cattgcgctc ggacttaaaa ttcaacgccg 120

cagatggtgc aagcagctgt gaaatgaggc gtagggcgcg gacgcgttcc agagaaagtg 180

caggcataac ccctaaaata ccctgatctt cccccgtgtc ctgcccccggt gtccaccct 240

35

gcgtacataa taggaacgc atg gga aaa cat gag gtt gct cag cag acg gtt 291

Met Gly Lys His Glu Val Ala Gln Gln Thr Val
1 5 10

40

ccg ggt cct tcg ccg gaa atg gaa gcg cag ccg cgt aaa gag ttg cgc 339

Pro Gly Pro Ser Pro Glu Met Glu Ala Gln Arg Arg Lys Glu Leu Arg
15 20 25

45

aag cac aag gcc att gcc act ggc ctg ttg att ttt gct gcc gct gta 387

Lys His Lys Ala Ile Ala Thr Gly Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ala Val
30 35 40

50

tat ttt ctt tgc cgt ttc gtg gag acc cgt ccg ggt gaa act gca gcg 435

Tyr Phe Leu Cys Arg Phe Val Glu Thr Arg Pro Gly Glu Thr Ala Ala
45 50 55

tgg gta ggt ttt gtg cgc gct gcg gca gag gcc gga atg att ggc ggg 483

Trp Val Gly Phe Val Arg Ala Ala Ala Glu Ala Gly Met Ile Gly Gly
60 65 70 75

55

ttg gcc gac tgg ttc gcg gtc acc gcg ctg ttc cgt cat cca ttg tgg 531

Leu Ala Asp Trp Phe Ala Val Thr Ala Leu Phe Arg His Pro Leu Trp
80 85 90

	ctg cct att ccg cac act gcg att atc ccg cgc aag aaa gac cag tta	579
	Leu Pro Ile Pro His Thr Ala Ile Ile Pro Arg Lys Lys Asp Gln Leu	
	95 100 105	
5	ggg gag gcc tta agc ggg ttt gtg ggg gat aac ttc cta aat gcc cag	627
	Gly Glu Ala Leu Ser Gly Phe Val Gly Asp Asn Phe Leu Asn Ala Gln	
	110 115 120	
10	ctc att acg gaa aaa gtc tct cag gcg cgg atc cca gag cgc gcc ggg	675
	Leu Ile Thr Glu Lys Val Ser Gln Ala Arg Ile Pro Glu Arg Ala Gly	
	125 130 135	
15	gag tgg ctc gcc cag ccg gaa aac ggg gag aaa gtt tcg cgc gaa gtc	723
	Glu Trp Leu Ala Gln Pro Glu Asn Gly Glu Lys Val Ser Arg Glu Val	
	140 145 150 155	
20	ggc aaa ttg acc gct aat att gtg cgc gca atc gat ccg tca gat gct	771
	Gly Lys Leu Thr Ala Asn Ile Val Arg Ala Ile Asp Pro Ser Asp Ala	
	160 165 170	
25	gaa gcg gtg att aaa tct gcg gtg atc gac aag ctt gcg gaa ccc acc	819
	Glu Ala Val Ile Lys Ser Ala Val Ile Asp Lys Leu Ala Glu Pro Thr	
	175 180 185	
30	tgg ggc cca cca gct ggg cgg ttg ctg gaa caa ctc ctc gcc gaa gca	867
	Trp Gly Pro Pro Ala Gly Arg Leu Leu Glu Gln Leu Leu Ala Glu Ala	
	190 195 200	
35	aag ccg aac cag ttg tcc agg aac tcg cgc agt ggc tgc aca aaa agg	915
	Lys Pro Asn Gln Leu Ser Arg Asn Ser Arg Ser Gly Cys Thr Lys Arg	
	205 210 215	
40	cgt tgg gct ccc gag ccg ctg att gat cgc ctg ctc aac gag cgc cgc	963
	Arg Trp Ala Pro Glu Pro Leu Ile Asp Arg Leu Leu Asn Glu Arg Arg	
	220 225 230 235	
45	ccg att tgg gcg ccg aaa ttc act gcg cag ctg gtc agc ggc aaa gtc	1011
	Pro Ile Trp Ala Pro Lys Phe Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Lys Val	
	240 245 250	
50	tat gac gag gtc ata aaa ttc act gaa gcc gtc gct gcc gat cct aac	1059
	Tyr Asp Glu Val Ile Lys Phe Thr Glu Ala Val Ala Ala Asp Pro Asn	
	255 260 265	
55	cac gag gcc cgc aaa tcg ctg cgc cga ttc ctt aat aaa ttg gcg caa	1107
	His Glu Ala Arg Lys Ser Leu Arg Arg Phe Leu Asn Lys Leu Ala Gln	
	270 275 280	
60	gac ctg cag cat gac cca ggc atg att att aaa gtt gaa gaa atc aaa	1155
	Asp Leu Gln His Asp Pro Gly Met Ile Ile Lys Val Glu Glu Ile Lys	
	285 290 295	
65	cgc gac atc atg ggc tcc ggc gcc atc gcg caa gcc gcg cca acc atc	1203
	Arg Asp Ile Met Gly Ser Gly Ala Ile Ala Gln Ala Ala Pro Thr Ile	
	300 305 310 315	
70	tgg gcg tca gcc tcc gag tcg ctc att gaa tcc gca gaa gat gag tca	1251
	Trp Ala Ser Ala Ser Glu Ser Leu Ile Glu Ser Ala Glu Asp Glu Ser	
	320 325 330	

tca att ctg cgt cgc aaa att gcc gaa gca gct acc agc tgg ggt caa 1299
 Ser Ile Leu Arg Arg Lys Ile Ala Glu Ala Ala Thr Ser Trp Gly Gln
 335 340 345
 5 aga ttg ctt gtc gac gac tcc ctc cgg cat tca ctc gac acc cgg att 1347
 Arg Leu Leu Val Asp Asp Ser Leu Arg His Ser Leu Asp Thr Arg Ile
 350 355 360
 10 acc ggc gcc gct gct ttc ctc gcc gac aat tac gcc ccc gaa gtc acc 1395
 Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Ala Asp Asn Tyr Ala Pro Glu Val Thr
 365 370 375
 15 ggc att atc tcc gaa acc att gaa cga tgg gac gct gaa gaa gct tca 1443
 Gly Ile Ile Ser Glu Thr Ile Glu Arg Trp Asp Ala Glu Glu Ala Ser
 380 385 390 395
 20 gag aaa atc gaa ctc atg gtg ggc aaa gac ctc caa tac atc cgc ctt 1491
 Glu Lys Ile Glu Leu Met Val Gly Lys Asp Leu Gln Tyr Ile Arg Leu
 400 405 410
 aat ggc aca att gta ggt gca tta gca gga ctg gcc att tac gct att 1539
 Asn Gly Thr Ile Val Gly Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ile Tyr Ala Ile
 415 420 425
 25 tcc cat atc ctc ttc gga gct taactaggag taaccatcat gtccgatgca 1590
 Ser His Ile Leu Phe Gly Ala
 430
 30 aaagacgatt ccattctgtc caagtggagc aatgcagctt ccgagctcag cgggtgccgtc 1650
 agtggagtag cgaagaagct ccgtgaagaa ctctctgaga aggaaacctt cagcaagctt 1710
 aaaaccgaag ccagcgaagc cgtcgatcaa gcaaagtccg gctcctacct agatgccggt 1770
 35 aaggaattcg cccgcg 1786
 <210> 2
 40 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <400> 2
 45 Met Gly Lys His Glu Val Ala Gln Gln Thr Val Pro Gly Pro Ser Pro
 1 5 10 15
 Glu Met Glu Ala Gln Arg Arg Lys Glu Leu Arg Lys His Lys Ala Ile
 20 25 30
 50 Ala Thr Gly Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ala Val Tyr Phe Leu Cys Arg
 35 40 45
 Phe Val Glu Thr Arg Pro Gly Glu Thr Ala Ala Trp Val Gly Phe Val
 55 50 55 60
 Arg Ala Ala Ala Glu Ala Gly Met Ile Gly Gly Leu Ala Asp Trp Phe
 65 70 75 80

Ala Val Thr Ala Leu Phe Arg His Pro Leu Trp Leu Pro Ile Pro His
 85 90 95
 5 Thr Ala Ile Ile Pro Arg Lys Lys Asp Gln Leu Gly Glu Ala Leu Ser
 100 105 110
 Gly Phe Val Gly Asp Asn Phe Leu Asn Ala Gln Leu Ile Thr Glu Lys
 115 120 125
 10 Val Ser Gln Ala Arg Ile Pro Glu Arg Ala Gly Glu Trp Leu Ala Gln
 130 135 140
 15 Pro Glu Asn Gly Glu Lys Val Ser Arg Glu Val Gly Lys Leu Thr Ala
 145 150 155 160
 Asn Ile Val Arg Ala Ile Asp Pro Ser Asp Ala Glu Ala Val Ile Lys
 165 170 175
 20 Ser Ala Val Ile Asp Lys Leu Ala Glu Pro Thr Trp Gly Pro Pro Ala
 180 185 190
 Gly Arg Leu Leu Glu Gln Leu Leu Ala Glu Ala Lys Pro Asn Gln Leu
 195 200 205
 25 Ser Arg Asn Ser Arg Ser Gly Cys Thr Lys Arg Arg Trp Ala Pro Glu
 210 215 220
 30 Pro Leu Ile Asp Arg Leu Leu Asn Glu Arg Arg Pro Ile Trp Ala Pro
 225 230 235 240
 Lys Phe Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Lys Val Tyr Asp Glu Val Ile
 245 250 255
 35 Lys Phe Thr Glu Ala Val Ala Ala Asp Pro Asn His Glu Ala Arg Lys
 260 265 270
 Ser Leu Arg Arg Phe Leu Asn Lys Leu Ala Gln Asp Leu Gln His Asp
 275 280 285
 40 Pro Gly Met Ile Ile Lys Val Glu Glu Ile Lys Arg Asp Ile Met Gly
 290 295 300
 45 Ser Gly Ala Ile Ala Gln Ala Ala Pro Thr Ile Trp Ala Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Glu Ser Leu Ile Glu Ser Ala Glu Asp Glu Ser Ser Ile Leu Arg Arg
 325 330 335
 50 Lys Ile Ala Glu Ala Ala Thr Ser Trp Gly Gln Arg Leu Leu Val Asp
 340 345 350
 Asp Ser Leu Arg His Ser Leu Asp Thr Arg Ile Thr Gly Ala Ala Ala
 355 360 365
 55 Phe Leu Ala Asp Asn Tyr Ala Pro Glu Val Thr Gly Ile Ile Ser Glu
 370 375 380
 Thr Ile Glu Arg Trp Asp Ala Glu Glu Ala Ser Glu Lys Ile Glu Leu

385 390 395 400
Met Val Gly Lys Asp Leu Gln Tyr Ile Arg Leu Asn Gly Thr Ile Val
 405 410 415
5
Gly Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ile Tyr Ala Ile Ser His Ile Leu Phe
 420 425 430
10 Gly Ala

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine für das dep67-Gen kodierende
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID
No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c)
- wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Efflux-
20 Proteins Dep67 aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
 - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
 - (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Hybridisierung unter einer Stringenz
entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
8. Coryneforme Bakterien, in denen das dep67-Gen
verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man
zumindest das dep67-Gen oder dafür kodierende
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere
überexprimiert;
 - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium
oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
5 g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9,
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das dep67-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9,
15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das dep67-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9,
20 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid dep67 kodiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9,
25 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
 - 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
30 kodierende Gen dapA,
 - 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap,

- 15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi,
- 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk,
- 5 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 10 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
- 15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lyse,
- 15 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr),
- 20 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
- 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
- 25 15.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1
- verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme

Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck*,
- 5 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi*,
- 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*
abschwächt.
- 10 17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
15 daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.
- 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für das Efflux-Protein Dep67 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *dep67*-Gens aufweisen,
20 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3
25 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid,
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der
5 Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit
einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine
Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in
20 denen zumindest das dep67-Gen verstärkt vorliegt, und die
Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen
Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.